Titulo

Termometría de fluorescencia para hipertermia con nanopartículas: Relación entre la intensidad de fluorescencia y la temperatura de un fluoróforo

Autor

Carlos Alejandro Garzón García (Estudiante Universidad Distrital Francisco José de Caldas)

- **Profesional responsable:** Profesora Adriana María De Mendoza Velázquez PhD, Pontificia Universidad Javeriana.
- **Director:** Profesor César Aurelio Herreño Fierro PhD, Universidad Distrital Francisco José de Caldas.

Introducción

La hipertermia terapéutica es una técnica prometedora para el tratamiento del cáncer que utiliza el aumento controlado de temperatura para eliminar células tumorales. Aunque se ha investigado desde los años 70, su aplicación presenta desafíos, especialmente en cuanto a la precisión y control de la temperatura para evitar daños en tejidos sanos [1, 2]. Recientemente, el campo ha experimentado un resurgimiento gracias a nuevas tecnologías que permiten una deposición de calor más precisa. Entre los métodos de control de temperatura, la termometría basada en fluorescencia ha ganado atención por su capacidad para realizar mediciones precisas y localizadas [3]. Esta técnica es particularmente útil en combinación con nanopartículas plasmónicas para tratamientos de hipertermia [1, 4]. Comprender la física detrás de la termometría de fluorescencia permitirá implementar esta técnica en experimentos de hipertermia, facilitando el estudio de la deposición de calor a escala celular y el avance de estas opciones terapéuticas.

Objetivo General

Entender la termometría de fluorescencia y su aplicación para la determinación de la temperatura en nanopartículas plasmónicas.

Objetivos Específicos

1. Comprender la física relacionada con los fenómenos fluorescentes dependientes de la temperatura.
2. Determinar los métodos de termometría de fluorescencia más apropiados para la medición de la temperatura de las nanopartículas en el interior celular.
3. Implementar un modelo matemático que permita cuantificar la temperatura de nanopartículas plasmónicas en ambientes intracelulares, con base en la intensidad de fluorescencia de un fluoróforo.

Plan de Trabajo

1. *Comprensión la física relacionada con los fenómenos fluorescentes dependientes de la temperatura.*

   La termometría basada en fluorescencia para nanopartículas requiere entender el funcionamiento de las moléculas fluorescentes. Los diagramas de Jablonski explican los fenómenos radiativos y no radiativos durante la absorción y emisión, describiendo relaciones entre constantes de velocidad, rendimiento cuántico y tiempo de vida de fluorescencia. Es crucial comprender cómo la temperatura afecta el rendimiento cuántico de una molécula fluorescente en solución y en interacción con nanopartículas. También es importante establecer la relación entre temperatura y la intensidad de emision, considerando desplazamientos termocrómicos y solvatocrómicos.

2. *Determinación los métodos de termometría de fluorescencia más apropiados para la medición de la temperatura de las nanopartículas en el interior celular.*

   Mediante una revisión bibliográfica de diversos métodos de termometría basada en fluorescencia, se identificaron las técnicas usadas para la medición de temperatura utilizando moléculas fluorescentes, considerando las propiedades específicas de estos compuestos.

3. *Implementación un modelo matemático que permita cuantificar la temperatura de nanopartículas plasmónicas en ambientes intracelulares, con base en la intensidad de fluorescencia de un fluoróforo.*

   Se implementó un modelo matemático basado en sistemas cuánticos abiertos que permite determinar la relación entre el tiempo de decaimiento del fluoróforo y la temperatura del ambiente.

Resultados

Los resultados se presentan a continuación, organizados según los objetivos específicos, comenzando con el segundo. Esto facilita una comprensión inductiva del documento.

Determinar los métodos de termometría de fluorescencia más apropiados para la medición de la temperatura de las nanopartículas en el interior celular.

Los métodos de termometría de fluorescencia consisten en técnicas para medir la temperatura utilizando las propiedades de fluorescencia de ciertos materiales. Estos métodos se basan en la sensibilidad térmica de los parámetros de fluorescencia, como la intensidad, la longitud de onda de emisión y el tiempo de vida en estado excitado, los cuales varían en función de la temperatura. El panel a de la Fig. (1) ilustra las estrategias más comunes para la detección de temperatura en entornos celulares e intracelulares. A continuación se describirán los métodos que usan estos parámetros para la determinación de la temperatura, centrándonos únicamente en las primeras cuatro estrategias. Las tres primeras son relevantes debido a su utilidad cuando la molécula fluorescente se modela como un sistema de dos niveles. La cuarta estrategia se incluye por ser la técnica más común según las revisiones de los artículos de Zhou et al. [5] y Okabe et al. [6]. En el primer estudio, esta técnica se empleó en 6 de los 15 estudios analizados (Tab. (1)), mientras que en el segundo, se utilizó en 13 de los 43 casos examinados (Tab. (2)), la 2 muestra un histograma con la frecuencia para cada una de las estrategias.

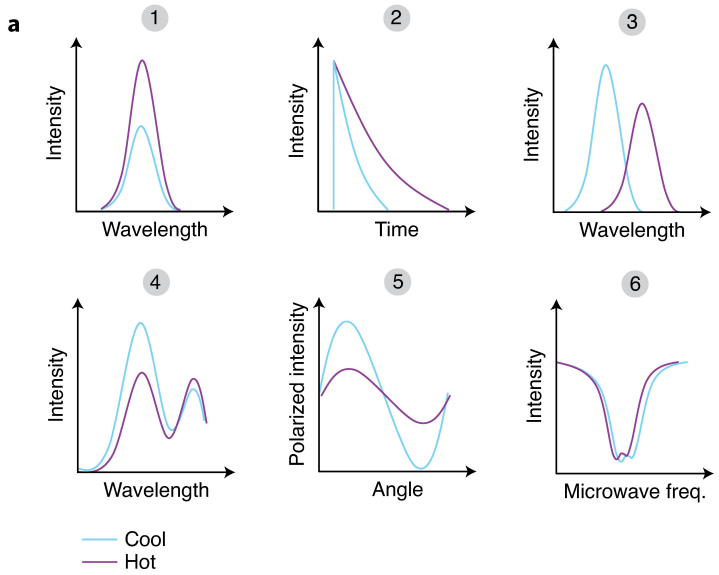

Figure 1: a. Estrategias de detección de temperatura basadas en la intensidad de emisión 1, el tiempo de vida 2, la posición del pico 3, la relación intensidad de emisión/excitación 4, la anisotropía de polarización de fluorescencia 5 y la resonancia de espín electrónico (ESR) o la resonancia magnética detectada ópticamente (ODMR) 6. Nota: tomado y modificado con permiso de [5]

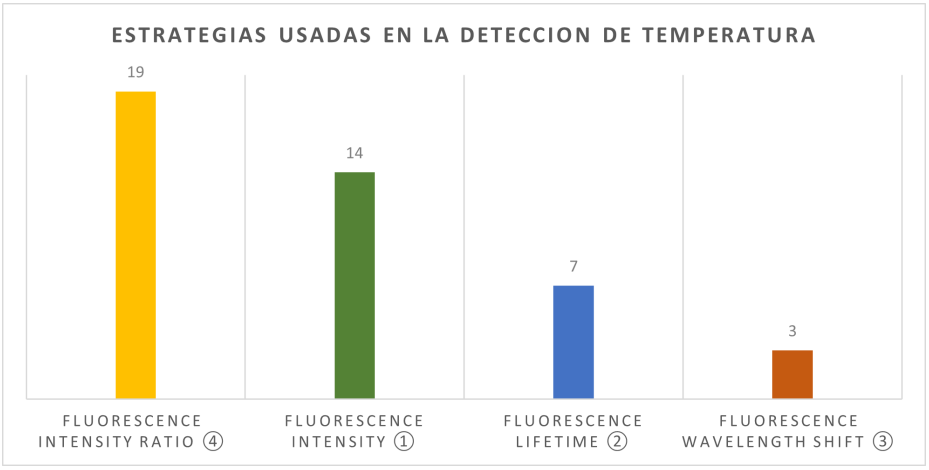

Figure 2: Histograma de la frecuencia con la cual se utilizan las estrategias 1, 2, 3 y 4 en los artículos [5] y [6]

La espectroscopía de fluorescencia es el método más común utilizado en las estrategias uno y tres (Fig. (1)). Esta técnica emplea un espectrofluorómetro para detectar el espectro de emisión de fluorescencia [7]. El instrumento capta los cambios en la intensidad y la longitud de onda de emisión del fluoróforo al interactuar con su entorno, lo que permite determinar características

específicas del medio, como su temperatura. La versatilidad de la espectroscopía de fluorescencia radica en su capacidad para registrar alteraciones sutiles en la emisión fluorescente, que están directamente relacionadas con las condiciones ambientales del fluoróforo [8].

Otro de los métodos utilizados para determinar la temperatura en ambientes celulares, basado en el tiempo de vida del fluoróforo, es la técnica de Fluorescence Lifetime-Resolved Imaging Microscopy (FLIM). Esta técnica de obtención de imágenes de fluorescencia permite medir directamente los atributos temporales de la emisión de luminiscencia en cada posición de una imagen de microscopio [9], mide el tiempo que un fluoróforo permanece en un estado excitado antes de emitir un fotón[10], cuantificando el tiempo que un fluoróforo permanece en un estado excitado antes de emitir un fotón [10]. La termometría de fluorescencia basada en el tiempo de vida se emplea para observar la distribución de temperatura en células vivas [6, 11]. Una de sus principales ventajas es la reducción de distorsiones causadas por tejidos complejos, ya que el tiempo de vida de la fluorescencia no se ve afectado por la dispersión y absorción de los tejidos ni por la concentración de termómetros [5].

Uno de los principales métodos que utiliza la estrategia numero 4 (Fig. 1) es el Ratiometric fluorescence thermometry. Este método se basa en la relación de intensidades de los picos de fluorescencia en dos longitudes de onda, con diferentes dependencias de intensidad de fluorescencia [12, 5]. Es un método excelente para visualizar distribuciones de temperatura independientes de la concentración espacial del fluoróforo, la intensidad de la luz de excitación y de la intensidad absoluta de la fluorescencia [12]. Además, presenta una resistencia relativamente alta a las interferencias ambientales [5]. Este método es comúnmente utilizado en ambientes intracelulares para la detección de la temperatura [5, 6, 11]

No se seleccionó un método específico, ya que no existe una estrategia única para la detección de temperatura mediante fluoróforos. En su lugar, se presentan tres métodos que permiten dicha medición, aprovechando las características propias de las moléculas fluorescentes.

Comprender la física relacionada con los fenómenos fluorescentes dependientes de la temperatura.

Los mecanismos de emisión de las moléculas fluorescentes pueden entenderse mediante varias aproximaciones conceptuales, que incluyen modelos clásicos, semiclásicos y finalmente cuánticos. La fluorescencia es un fenómeno que ocurre cuando una molécula es excitada a un estado singlete y, posteriormente, decae a otro estado singlete de menor energía, emitiendo luz y disipando energía mediante otros mecanismos [13]. En los estados singletes excitados, el electrón del orbital excitado está emparejado con el segundo electrón del orbital del estado base (de espín opuesto). Como resultado, el retorno al estado base es permitido por espín y ocurre rápidamente mediante la emisión de un fotón de menor energia[8]. Esto genera un desplazamiento del espectro de emisión hacia energías menores, conocido como corrimiento de Stokes [8, 1], junto con un cambio en la intensidad de emisión de la molécula. Este corrimiento está generalmente relacionado con la polaridad del solvente en el cual se encuentra la molécula fluorescente. Cuanto más polar sea el solvente, mayor será el corrimiento de Stokes observado y el cambio de intensidad. Esto se debe a que existe una mayor disipación de energía por mecanismos no radiativos, siempre y cuando la molécula fluorescente también sea polar [8]. El corrimiento de Stokes puede modelarse de manera general mediante la ecuación de Lippert, que relaciona la diferencia entre los máximos del espectro de absorción y emisión con características propias de la molécula fluorescente (momento dipolar) y del solvente (constante dieléctrica e índice de refracción) [8, 1].

Las tasas de decaimiento radiativo (k_f) y no radiativo (k_i) relacionadas con la desexcitación

del fluoróforo, y su intensidad de emisión constituyen dos parámetros fundamentales para el uso de las moléculas fluorescentes como sondas, que permiten la medición de la temperatura a nivel intracelular [8, 1]. Estos parámetros son el rendimiento cuántico (Ec. (1)) y el tiempo de vida en estado excitado (Ec. (2)) los cuales se ven afectados por el cambio de la temperatura del ambiente en el que se encuentre la molécula fluorescente. Estos parámetros son los utilizados para la detección de la temperatura de las estrategias 1 y 2 (fig.(1))

Las moléculas fluorescentes se emplean como sondas para medir la temperatura a nivel intracelular, basándose en dos parámetros fundamentales: el rendimiento cuántico (Ec. (1)) y el tiempo de vida en estado excitado (Ec. (2)) [8, 1]. Estos parámetros están directamente relacionados con las tasas de decaimiento radiativo (k_f) y no radiativo (k_i) del fluoróforo, así como con su intensidad de emisión (I_F)[7]. La sensibilidad de estos parámetros a los cambios de temperatura del entorno de la molécula fluorescente los convierte en la base de las estrategias 1 y 2 (Fig.(1)) para la detección de temperatura

$$\phi_F = \frac{k_f}{k_f + k_i} = \frac{I_F}{I_A} \tag{1}$$

$$\tau = \frac{1}{k_f + k_i}. \tag{2}$$

Por lo tanto, resulta fundamental comprender la emisión de las moléculas fluorescentes en relación con sus tasas de decaimiento. Inicialmente, es esencial entender la interacción de la molécula con un campo externo que la excita. Desde una perspectiva semiclásica, se requiere comprender la interacción átomo-campo, ya que la molécula fluorescente, para este trabajo, se asume como un sistema de dos niveles debido a su estructura dipolar [8]. En este caso, el átomo se modela cuánticamente, utilizando operadores de transición electrónica y matrices de Pauli, mientras que el campo se modela clásicamente, se asume por simplicidad que tiene un único modo de vibración resonante[14]. Basándose en la aproximación dipolar y de onda rotante, y considerando que la frecuencia de transición electrónica y la del campo están cerca de resonar, se soluciona la ecuación de Schrödinger para obtener un vector de estado que describe las amplitudes de probabilidad ($c_a(t)$ y $c_b(t)$) de encontrar al electrón en uno de los dos niveles del átomo. La diferencia de estas probabilidades (para ver el desarrollo detallado diríjase a [18])

$$\begin{aligned} W(t) &= |c_a(t)|^2 - |c_b(t)|^2 \\ &= \left(\frac{\Delta^2 - \Omega_R^2}{\Omega^2}\right) \sin^2\left(\frac{\Omega t}{2}\right) + \cos^2\left(\frac{\Omega t}{2}\right) \end{aligned} \tag{3}$$

resulta en la inversión, que explica las oscilaciones de la población en ambos niveles electrónicos con una frecuencia Ω, que involucra el termino de resonancia Δ con la frecuencia de Rabi Ω_R. Desde esta perspectiva semiclásica, se observa que la emisión y absorción de luz están mediadas directamente por la existencia del campo electromagnético. Este modelo, sin embargo, presenta limitaciones: no muestra una dependencia explícita de la temperatura y no considera la interacción con un entorno a temperatura finita.

Esta primera aproximación conceptual sirve como base matemática para el entendimiento de la teoría cuántica de la interacción átomo-campo, en la cual tanto el átomo como el campo se modelan cuánticamente. En esta teoría, el campo se modela utilizando la cuantización del campo electromagnético [14, 15], el cual contiene n fotones, y esta inicialmente en un estado coherente ($\rho_{nn}(0)$). De la misma manera que en la teoría semiclásica, se soluciona la ecuación

de Schrödinger que permite determinar las probabilidades de encontrar al electrón en uno de los dos niveles, con lo cual se construye nuevamente la inversión (para ver el desarrollo detallado diríjase a [18])

$$\begin{aligned} W(t) &= \sum_{n} [|c_{a,n}(t)|^2 - |c_{b,n}(t)|^2] \\ &= \sum_{n=0}^{\infty} \rho_{nn}(0) \left[\frac{\Delta^2}{\Omega_n^2} + \frac{4g^2(n+1)}{\Omega_n^2} \cos(\Omega_n t) \right]. \end{aligned} \tag{4}$$

El escenario descrito demuestra que, incluso sin un campo electromagnético interactuante, se produce una inversión de población (para ver el desarrollo detallado diríjase a [18])

$$W(t) = \frac{1}{\Delta^2 + 4g^2} \left\{ \Delta^2 + 4g^2 \cos\left[(\Delta^2 + 4g^2)^{1/2} t \right] \right\}, \tag{5}$$

con una fase que depende del termino de resonancia Δ y la frecuencia de Rabi g. Tal resultado implica que el átomo emite luz debido a su interacción con los modos del vacío, fenómeno conocido como emisión espontánea [14].

La interacción átomo-campo permite comprender la emisión cuando un sistema de dos niveles interactúa únicamente con un campo electromagnético. Sin embargo, es crucial considerar también la interacción con el medio circundante, lo que requiere el uso de modelos para sistemas cuánticos abiertos. En estos sistemas, tanto el sistema de dos niveles como el medio se modelan cuánticamente [16]. La ecuación maestra de Lindblad [16, 17] (para ver el desarrollo detallado diríjase a [18])

$$\dot{\rho}(t) = -i[H + H_{Ls}, \rho(t)] + \sum_{\substack{\omega \\ k,l}} \gamma_{kl}(\omega) \left(S_l(\omega) \rho(t) S_k^\dagger(\omega) - \frac{1}{2} \left\{ S_k^\dagger(\omega) S_l(\omega), \rho(t) \right\} \right), \tag{6}$$

se obtiene bajo tres aproximaciones fundamentales: el acoplamiento débil, que asume que la influencia del sistema sobre el reservorio es pequeña; la aproximación de Markov, que considera que los tiempos de variación del sistema son mayores que los tiempos propios del baño; y la aproximación de onda rotante, que elimina los términos que oscilan rápidamente.

Esta ecuación de movimiento para el sistema de dos niveles comprende dos términos. El primero incorpora la evolución unitaria de la matriz densidad mediante el hamiltoniano H, junto con un corrimiento de los niveles de energía debido a la interacción con el baño dados por el hamiltoniano del corrimiento de Lamb H_{Ls} [16] relacionado así:

$$\pi_{kl}(\omega) = \frac{-i}{2} (\Gamma_{kl}(\omega) - \Gamma_{kl}^*(\omega)). \tag{7}$$

El segundo término, el disipador, está directamente relacionado con la interacción entre el sistema y el ambiente, siendo este radiación electromagnética. Este término permite establecer una relación entre la temperatura y la intensidad de emisión. En el disipador, $S(\omega)$ representa los operadores del sistema de dos niveles.

El término $\gamma_{kl}(\omega)$ es la parte real de la función de correlación temporal (Γ_{kl}) de los operadores del baño que se relaciona con el espacio de frecuencias de transición del sistema de dos niveles de esta manera (para ver el desarrollo detallado diríjase a [18]):

$$\gamma_{kl}(\omega) = \Gamma_{kl}(\omega) + \Gamma_{kl}^*(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} ds e^{i\omega s} \mathrm{Tr}[E_k^\dagger(s) E_l \hat{\rho}_E(0)]. \tag{8}$$

La solución de esta ecuación proporciona el término de disipación resultante de la interacción entre el sistema de dos niveles y su entorno.

Implementar un modelo matemático que permita cuantificar la temperatura de nanopartículas plasmónicas en ambientes intracelulares, con base en la intensidad de fluorescencia de un fluoróforo.

Para establecer una relación entre las tasas de decaimiento, que son el inverso de los tiempos de vida del estado excitado del fluoroforo, y la temperatura, es necesario derivar la ecuación maestra de Lindblad Ec.(6), considerando un escenario más complejo. En este caso, el sistema de dos niveles interactúa simultáneamente con dos elementos distintos. Por un lado, se tiene un láser, representado por un campo electromagnético de un único modo en un estado coherente. Por otro lado, se considera un reservorio térmico, modelado mediante un baño bosónico de múltiples modos a una temperatura T. Bajo estas consideraciones, la dinámica del sistema que incorpora los efectos tanto del láser como del entorno térmico se describe mediante (para ver el desarrollo detallado diríjase a [18]):

$$\begin{aligned}\dot{\rho(t)} =& -i[H + H_{Ls}, \rho(t)] + \frac{i\Omega}{2}[\sigma_+ + \sigma_-, \rho(t)] \\ &+ \gamma_0(N+1)\left(\sigma_-\rho(t)\sigma_+ - \frac{1}{2}\sigma_+\sigma_-\rho(t) - \frac{1}{2}\rho(t)\sigma_+\sigma_-\right) \\ &+ \gamma_0 N\left(\sigma_+\rho(t)\sigma_- - \frac{1}{2}\sigma_-\sigma_+\rho(t) - \frac{1}{2}\rho(t)\sigma_-\sigma_+\right). \end{aligned} \tag{9}$$

Esta ecuación describe los procesos de emisión espontánea (tasa γ_0) relacionada con el momento dipolar del sistema de dos niveles $\vec{d}$, así como los procesos de emisión y absorción inducidos térmicamente ($\gamma_0 N$) [16], siendo Ω la frecuencia de Rabi. La suma de estos procesos da lugar a una tasa de transición total, que se denota como

$$\gamma = \gamma_0(2N+1), \tag{10}$$

donde

$$\gamma_0 = \frac{4\omega_0^3|\vec{d}|^2}{3\hbar c^3} \tag{11}$$

y

$$N = \frac{1}{\exp\left[\frac{\hbar\omega}{k_B T}\right] - 1}, \tag{12}$$

siendo N La función de distribución de Plank, que esta relacionada con la temperatura del ambiente.

Por lo tanto la tasa de decaimiento en en función de la temperatura estaría dada por

$$\gamma = \gamma_0\left(\frac{2}{\exp\left[\frac{\hbar\omega}{k_B T}\right] - 1} + 1\right). \tag{13}$$

Conclusiones

La pasantía se desarrolló de manera satisfactoria, cumpliendo adecuadamente los objetivos planteados.

Los métodos de termometría de fluorescencia proporcionan diversas técnicas para medir la temperatura a nivel celular, aprovechando la sensibilidad térmica de parámetros como la intensidad, el tiempo de vida y la longitud de onda de emisión. Entre estas técnicas, la espectroscopía y la microscopía de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM) destacan por su utilidad para moleculas fluorescentes modeladas como sistemas de dos niveles. Dado que no existe una estrategia única para la detección de temperatura mediante fluoróforos, no se seleccionó un método específico. En cambio, se presentan tres métodos que utilizan las características propias de las moléculas fluorescentes para la medición de temperatura.

Se logró una comprensión profunda de los mecanismos de emisión de las moléculas fluorescentes y se estableció una relación cuantitativa entre la temperatura y las tasas de decaimiento en sistemas fluorescentes de dos niveles. Esto proporciona un fundamento teórico para la detección de temperatura a nivel intracelular. El modelo cuántico presentado, basado en la ecuación maestra de Lindblad, incorpora los efectos del entorno térmico y de un láser en la dinámica del sistema de dos niveles que representa la molécula fluorescente.

La tasa de transición total γ demuestra una dependencia directa con la temperatura del ambiente, manifestada a través de la función de distribución de Plank N. Un aumento en la temperatura incrementa N y, consecuentemente, eleva γ. Este incremento en las tasas de decaimiento afecta directamente el rendimiento cuántico y el tiempo de vida en estado excitado de las moléculas fluorescentes.

Estos cambios en la intensidad de fluorescencia y en el tiempo de vida del estado excitado constituyen la base para el uso de fluoróforos como sensores de temperatura en entornos intracelulares.

References

[1] Jianfeng Lou et al. "Fluorescence-Based Thermometry:Principles and Applications". In: *Reviews in analytical chemistry* 18.4 (July 1999). DOI: 10.1515/revac.1999.18.4.235. URL: https://doi.org/10.1515/revac.1999.18.4.235.

[2] P Wust et al. "Hyperthermia in combined treatment of cancer". In: *Lancet oncology/Lancet. Oncology* 3.8 (July 2002), pp. 487–497. DOI: 10.1016/s1470-2045(02)00818-5. URL: https://doi.org/10.1016/s1470-2045(02)00818-5.

[3] Stefano Freddi et al. "A molecular thermometer for nanoparticles for optical hyperthermia". In: *Nano Letters* 13.5 (May 2013), pp. 2004–2010. ISSN: 15306984. DOI: 10.1021/nl400129v.

[4] Kohki Okabe et al. "Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy". In: *Nature communications* 3.1 (July 2012). DOI: 10.1038/ncomms1714. URL: https://doi.org/10.1038/ncomms1714.

[5] Jiajia Zhou et al. *Advances and challenges for fluorescence nanothermometry.* Oct. 2020. DOI: 10.1038/s41592-020-0957-y.

[6] Kohki Okabe et al. *Intracellular thermometry with fluorescent sensors for thermal biology.* May 2018. DOI: 10.1007/s00424-018-2113-4.

[7] Jihad Rene Albani. *Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy*. Wiley-Blackwell, July 2007.

[8] Joseph R Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, July 2010.

[9] J Slavík. *Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes*. Springer Science & Business Media, July 2013.

[10] Rupsa Datta et al. "Fluorescence lifetime imaging microscopy: fundamentals and advances in instrumentation, analysis, and applications". In: *Journal of biomedical optics* 25.07 (July 2020), p. 1. DOI: 10.1117/1.jbo.25.7.071203. URL: https://doi.org/10.1117/1.jbo.25.7.071203.

[11] Shuai Li et al. *Response strategies and biological applications of organic fluorescent thermometry: cell- and mitochondrion-level detection*. Mar. 2024. DOI: 10.1039/d4ay00117f.

[12] Masakazu Umezawa et al. "Temperature imaging inside fluid devices using a ratiometric near infrared (NIR-II/III) fluorescent Y2O3: Nd3+, Yb3+, Er3+ nanothermometer". In: *Analytical sciences* 40.7 (July 2024), pp. 1323–1330. DOI: 10.1007/s44211-024-00564-0. URL: https://doi.org/10.1007/s44211-024-00564-0.

[13] Nicholas J Turro. *Modern Molecular Photochemistry*. Benjamin-Cummings Publishing Company, July 1978.

[14] Marlan O Scully and M Suhail Zubairy. *Quantum Optics*. Cambridge University Press, July 1997.

[15] Mark Fox. *Quantum Optics*. Oxford University Press, July 2006.

[16] Heinz-Peter Breuer and Francesco Petruccione. *The Theory of Open Quantum Systems*. Oxford University Press, USA, July 2002.

[17] Daniel Manzano. "A short introduction to the Lindblad master equation". In: *AIP Advances* 10.2 (Feb. 2020). ISSN: 21583226. DOI: 10.1063/1.5115323.

[18] Carlos Garzón. "Termometría de fluorescencia para hipertermia con nanopartículas: relación entre la intensidad de fluorescencia y la temperatura de un fluoróforo". https://drive.google.com/drive/folders/14f39M6JmMQu1hRvDD5rjF-fmjdJX9RUz?usp=sharing

Anexo

Table 1 | Fluorescent nanothermometers for intracellular temperature measurements

Nanothermometers		Sensing strategy[a]	Entry into cell	Cell line(s)	Localization	S_r^{max} (T)	ΔT_{min}	Stimulation performed	Feedback	Ref.
FPs	tsGFP1-mito, tsGFP1-ER, tsGFP1-F	④	Transfection	HeLa, BAs	Mitochondria	2.82% K^{-1} (47 °C)	–	CCCP	Heterogeneous thermogenesis correlates with electrochemical gradient	6
				C2C12	ER			CPA	Visualize SERCA1-mediated thermogenesis in myotubes	
	gTEMP	④	Transfection	HeLa	Mitochondria	1.15% K^{-1} (34 °C)	0.4 °C	FCCP	Temperature rise of 6–9 °C at the mitochondria matrix	35
					Whole cell		0.1 °C	–	Temperature difference of 2.9 ± 0.3 °C between the cytosol and the nucleus	
	EmGFP-Mito	③	Transfection	HeLa	Mitochondria	2.2% K^{-1} (23 °C)	0.26 °C (23–39 °C)	FCCP	Mean temperature rise of 3 °C	36
Dyes	ER thermos yellow	①	Incubation at 37 °C for 30 min	HeLa	ER	–	0.2 °C	Ionomycin	Mean temperature rise of 1.6 ± 0.8 °C (6 cells)	40
	ERthermAC	①	Incubation at 37 °C for 30 min	hBAs	ER	–	–	Forskolin	Heterogeneous response (89.7% of responding cells and 10.3% non-responding cells)	37
	RhB-ME and Rh800	④	Incubation at 33 °C for 1h	BAs	Mitochondria	–	–	CCCP	Maximum transient rate of mitochondrial temperature increase is on the order of ~10^{-2}–10^{-1} K s^{-1}	38
								NE	Heterogeneous response (59.4 ± 15.9% responding cells for 118 cells)	
	Mito-TEM	①	Incubation at 37 °C for 30 min	MCF-7	Mitochondria	–	–	PMA	Temperature rise of 3 °C from 29 to 32 °C within 10 min; slower change rate in the next 20 min	96
	Mito Thermo Yellow	①	Incubation at 37 °C for 15 min	NIH/3T3, HeLa, C2C12, mESC, Chang, BA	Mitochondria	2.0–2.8% K^{-1}	–	Laser heating	Temperature gradient	93
Polymeric nanoparticles		① ②	Microinjection	COS7	Whole cell	–	0.18–0.58 °C (29–39 °C)	Glucose metabolism	Mean temperature difference of 0.96 °C between nucleus and cytoplasm (62 cells); cell-cycle-dependent temperature gap; centrosome is warmer (by 0.75 °C on average) than cytoplasm	8
								FCCP	Mean temperature change of 1.02 ± 0.17 °C inside COS7 cells for 30 min (7 cells)	
		②	Incubation at 25 °C for 10 min	COS7	Whole cell	–	0.05–0.54 °C (28–38 °C)	CCCP	Mean temperature rise of 1.57 ± 1.41 °C (17 cells)	108
		④	Targeting/ incubation for 3 h	HeLa	Cytoplasm	–	0.3–0.5 °C (32–39 °C)	Ionomycin	Temperature rise from 34.5 °C to 39 °C within 2 min	109
		④	Targeting/ incubation for 3 h	HeLa	Mitochondria	–	<0.98 ± 0.08 °C (31–39 °C)	FCCP, Ionomycin	Temperature rise from 32.6 °C to 35 °C within 2 min (75% decrease in ATP), then decrease as the cells shrank (ATP remained unchanged)	110
Lanthanide complex		④	Incubation at 37 °C for 2 h	HeLa	Endosomes or lysosomes	–	–	Ionomycin	Mean temperature rise of 1.9 ± 0.8 °C (8 cells); heterogeneous heat production in degrees, space and time	46
QDs	QD655	③	Incubation at 37 °C for 1 h	NIH/3T3	Cytoplasm	–	–	Ionomycin	Heterogeneous temperature response (31 cells: 23% decrease, 23% no change, 54% rise); mean temperature change of −0.14 ± 0.15 °C before shock and +1.84 ± 0.27 °C after shock	47
	QD655	④	Incubation at 37 °C for 1 h	SH-SY5Y	Cytoplasm	6.3% K^{-1}	0.098	CCCP	Mean temperature change of 0.94 °C; mean temperature difference of 1.6 °C between the cell body and a neurite	48

[a]Numbers indicate the type of temperature-sensing strategy, as categorized in Fig. 1a.

Tabla 1: Nanotermómetros fluorescentes para medir la temperatura intracelular. Nota: tomado con permiso de [5]

Table 1 Fluorescent thermosensors used for intracellular thermometry

Section	Year	Technique						Application			Ref.
		Material	Sensor name	Detection	Introduction method	Resolution (°C)	Sensitivity (%/°C)	Cell type	Localization	Observed thermogenesis	
Small organic compounds	1998	Metal complex	Eu-TTA	Phosphorescence intensity	Liposome	N/A	N/A	CHO	Cell membrane	Endogenous	[87]
	2007	Metal complex	Eu-TTA within micropipette	Fluorescence intensity	Physical contact of micropipette	N/A	2.7	HeLa	N/A	Chemically-induced	[66]
	2014	Metal complex	Eu-TTA, rhodamine 101	Fluorescence intensity ratio	Internalization	0.5	N/A	HeLa	N/A	Chemically-induced	[68]
	2014	Organic compound	ER thermoyellow	Fluorescence intensity	Internalization	0.4	3.9	HeLa, differentiated myoblast, NIH3T3, Chang, brown adipose	ER	Chemically-induced	[2]
	2015	Organic compound	Mito-RTP	Fluorescence intensity ratio	Internalization	0.6	2.7	HeLa	Mitochondria	Chemically-induced	[25]
	2015	Organic compound	Mito thermoyellow	Fluorescence intensity	Internalization	0.3	2.0–2.8	HeLa, differentiated myoblast, mESC, NIH3T3, Chang, brown adipose	Mitochondria	Chemically-induced	[3]
Synthetic polymer	2009	Polyacrylamide polymer	NIPAM-DBD (nanogel, FNT)	Fluorescence intensity	Microinjection	0.29–0.50	N/A	COS7	Cytoplasm	Chemically-induced	[20]
	2011	Polymeric micelle	ICG/Pluronic F-127/PEI micelle	Fluorescence intensity	Internalization	N/A	N/A	A431	N/A	N/A	[9]
	2011	Polymer dots (Pdots)	Pdot-RhB	Fluorescence intensity ratio	Internalization	N/A	N/A	HeLa	N/A	N/A	[86]
	2011	Polymeric micelle	HMA/Pluronic P85/TRITC micelle	Fluorescence intensity ratio	Internalization	N/A	N/A	HeLa	Cytoplasm	N/A	[16]
	2012	Polyacrylamide polymer	PNIPAm-MAn-AMC	Fluorescence intensity	Internalization	N/A	N/A	MDCK	Cytoplasm	N/A	[56]
	2012	Polyacrylamide polymer	NNPAM-DBD (FPT)	Fluorescence lifetime/ Fluorescence intensity	Microinjection	0.18–0.58	N/A	COS7, HeLa	N/A	Endogenous and chemically-induced	[52]
	2013	Polyacrylamide polymer	Cationic NNPAM-DBD	Fluorescence lifetime	Internalization	0.09–0.78	N/A	Yeast, MOLT-4, HEK293T	N/A	N/A	[74]
	2014	Polyacrylamide polymer	PNIPAm/NBD/RhBAM	Fluorescence intensity ratio	Internalization	0.3–0.5	N/A	HeLa	N/A	Chemically-induced	[57]
	2015	Polyacrylamide polymer	PNIPAm/NBD/NSVB/TfAuNCs	Fluorescence intensity ratio	Internalization	0.3–0.5	N/A	HeLa	N/A	Chemically-induced	[58]
	2015	Polyacrylamide polymer	Cationic NNPAM/DBThD/BODIPY	Fluorescence intensity ratio	Internalization	0.01–0.25	N/A	MOLT-4, HEK293T	N/A	N/A	[76]
	2015	Polyacrylamide polymer	PNIPAM/CMA, PNIPAM/NBDAE, PNIPAM/RhBEA	Fluorescence intensity ratio (FRET)	Internalization	N/A	N/A	HepG2	Cytoplasm	Chemically-induced	[27]
	2015	Polyacrylamide polymer	Cationic NNPAM/DBThD	Fluorescence lifetime	Internalization	0.05–0.54	N/A	HeLa, COS7, NIH3T3	N/A	Endogenous and chemically-induced	[24]
	2017	Polyacrylamide polymer	PNIPAM/BODIPY	Fluorescence intensity/ Fluorescence lifetime	Internalization	N/A	N/A	BHK	N/A	N/A	[18]
Fluorescent protein	2011	Protein and fluorescent dye system	C12FDG	Fluorescence intensity	Transformation, gene knock-in	0.7	N/A	*E. coli*	N/A	Exogenous	[45]
	2012	Fluorescent protein	GFP	Fluorescence anisotropy	Transfection	0.4	0.4	HeLa, U-87 MG	Cytoplasm	Exogenous	[12]

Table 1 (continued)

Section	Year	Technique						Application			Ref.
		Material	Sensor name	Detection	Introduction method	Resolution (°C)	Sensitivity (%/°C)	Cell type	Localization	Observed thermogenesis	
	2013	Fluorescent protein	GFP	Fluorescence anisotropy	Gene knock-in	0.8	1.4	*C. elegans*	Cytoplasm	Exogenous	[13]
	2013	Fluorescent protein	tsGFP	Fluorescence intensity ratio	Transfection, viral infection	0.5	N/A	HeLa, brown adipocyte, differentiated myotube	Cytoplasm, ER, mitochondria, plasma membrane	Endogenous	[35]
	2017	Fluorescent protein	gTEMP	Fluorescence intensity ratio	Transfection, gene knock-in, mRNA injection	0.4	2.6	HeLa, medaka	Cytoplasm, nucleus, mitochondria	Endogenous and chemically-induced	[50]
Inorganic materials	2010	Nano particle	$NaYF_4$: Er^{3+}, Yb^{3+} NPs	Fluorescence intensity ratio	Internalization	N/A	N/A	HeLa	N/A	Exogenous	[79]
	2010	Quantum dot	CdSe-QD	Fluorescence wavelength shift	Internalization	N/A	0.025	HeLa	N/A	Exogenous	[42]
	2011	Quantum dot	Quantum dot (QD655)	Photoluminescence spectral shifts	Endocytosis	N/A	0.016	HeLa, NIH3T3	N/A	Chemically-induced	[84]
	2012	Quantum dot	Quantum dot-quantum rods (QD-QRs)	Photoluminescence ratio	Cationic polymer-based in-corporation	0.1	2.4	HeLa, NIH3T3	N/A	Exogenous	[1]
	2013	Quantum dot	CdSe-QD	Photoluminescence spectral shifts	Internalization	N/A	0.016	lymphocytes	N/A	Exogenous	[22]
	2013	Quantum dot	CdSe-QD	Fluorescence spectral shift	Internalization	N/A	0.025	HeLa	N/A	Exogenous	[43]
	2013	Gold nanocluster	Au nanocluster	Fluorescence lifetime	Internalization	0.3–0.5	N/A	HeLa	N/A	Exogenous	[63]
	2013	Nanodiamond	Nanodiamonds nitrogen-vacancy center	Normalized fluorescence	Nanowire-assisted delivery	0.044	N/A	Fibroblast WS1	N/A	Exogenous	[38]
	2017	Nanodiamond	Gold nanorod-fluorescent nanodiamond hybrid	Normalized fluorescence	Internalization	N/A	N/A	HEK293T	N/A	Exogenous	[72]
	2014	Silica nanoparticle	$Ru(bpy)_3^{2+}$ doped silica nanoparticle	Luminescence intensity	Internalization	N/A	1.26	HepG2	N/A	Exogenous	[85]
	2015	Metal nanocluster	Cu nanocluster	Photoluminescence intensity	Internalization	N/A	N/A	MC3T3-E1	N/A	Exogenous	[82]
	2015	Quantum dot	Polymer encapsulated quantum dot	Photoluminescence	Internalization	0.43	1.6	HepG2	N/A	Exogenous	[41]
	2016	Quantum dot	Quantum dot (QD655)	Fluorescence intensity ratio	Endocytosis	0.098	6.2	SH-SY5Y	N/A	Chemically-induced	[70]
	2016	Fluorescent up-converting particle	$NaYF_4$:Er^{3+}, Yb^{3+} nanoparticle	Fluorescence intensity ratio	N/A (Cell surrounding)	N/A	1.6	HeLa	N/A	Exogenous	[60]
Others	1998	Infrared thermography	Infrared camera	Thermal radiation	N/A (Remote monitoring)	–	–	Yeast, adipocyte	N/A	Endogenous and chemically-induced	[54]
	2011	Thermocouple	Pt-W thermocouple	Thermoelectricity	Insertion	–	–	U251	N/A	Chemically-induced	[81]
	2012	Resonant thermal sensor	Si resonator	Resonant frequency of the resonator	Physical contact	–	–	Brown fat cell	N/A	Endogenous	[30]
	2013	Photoacoustic imaging contrast reagent	Iron oxide micro-particle	Photoacoustic thermometry	Internalization	–	–	HeLa	N/A	Exogenous	[17]
	2014	Microcantilever	Bimaterial microcantilever	Microcantilever displacement	Physical contact	–	–	Brown adipocyte	N/A	Endogenous	[62]

Tabla 2: Termosensores fluorescentes para termometría intracelular. Nota: tomado de [6]